

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 1 月 8 日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/003021 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C07K 16/18, C12N 5/16, 15/13, A61K 39/395, A61P 31/18
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008305
- (22) 国際出願日: 2003 年 6 月 30 日 (30.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-227953 2002 年 7 月 1 日 (01.07.2002) JP
特願2003-74316 2003 年 3 月 18 日 (18.03.2003) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 岡田 秀親 (OKADA, Hidechika) [JP/JP]; 〒467-0803 愛知県名古屋市瑞穂区中山町 1 丁目 10 番地 1 号 エクレール桜山 206 Aichi (JP). 岡田 則子 (OKADA, Noriko) [JP/JP]; 〒467-0803 愛知県名古屋市瑞穂区中山町 1 丁目 10 番地 1 号 エクレール桜山 206 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 廣江 武典, 外 (HIROE, Takenori et al.); 〒500-8368 岐阜県岐阜市宇佐三丁目 4-3 Gifu (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 補正書・説明書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN IgM ANTIBODY INDUCING APOPTOSIS IN HIV-INFECTED CELLS AND REMEDY FOR HIV-INFECTION

(54) 発明の名称: HIV 感染細胞にアポトーシスを誘導するヒト IgM 抗体及び HIV 感染症治療剤

(57) Abstract: A monoclonal antibody falling within the category of human IgM which specifically recognizes HIV-infected cells and induces apoptosis is obtained. Using the obtained antibody, it is intended to provide a remedy for patients suffering from HIV-infection, which contains as the active ingredient a human IgM antibody capable of specifically reacting with HIV-infected cells, inducing apoptosis in the infected cells and thus disrupting the cells, etc.

(57) 要約: HIV 感染細胞を特異的に認識しアポトーシスを誘導するヒト IgM に属するモノクローナル抗体を得た。得られた抗体を用いて HIV 感染細胞に特異的に反応し、感染細胞にアポトーシスを誘導して破壊に導くヒト IgM 抗体を有効成分とする HIV 感染患者治療剤等を提供する。

WO 2004/003021 A1

明 細 書

HIV感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgM抗体及びHIV感染症治療剤

5 技術分野

本発明は、HIV感染細胞に特異的に反応し、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgMモノクローナル抗体及びかかる抗体を有効成分として含有するHIV感染症治療剤に関する。

10 背景技術

HIV感染症に対しては、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼインヒビターとして種々の薬剤が開発されている。これらの薬剤を3種類ないし4種類を併用する多剤併用療法（HAART：Highly Active Anti-Retroviral Therapy）がHIV感染患者に有効性を発揮し、血中HIV量の激減やCD4リンパ球量の改善などをもたらすことが出来るようになった。しかし、多剤併用療法によっても潜伏感染細胞は排除することはできず、HIV感染患者を完全に治癒させることは難しく、HIVが潜伏感染した細胞は、薬剤投与を中止するとHIVは再燃して増殖するという問題があった。

多剤併用療法を間欠的に中断再開を繰り返すとHIVに対する免疫応答が効率良く誘導される場合のあることが報告されているが、確実な治療法とはなっていない。これは、HIVに対する免疫反応の重要性を示している知見である。

HIV感染細胞に特異的に反応するヒト（型）モノクローナル抗体は、遺伝子組換えによりヒト型化した抗体が作成されているが、それらはIgGタイプの抗体である。それらは、HIVの感染を阻害する中和抗体であるが、感染細胞を傷害することは出来ない。

ヒトの細胞膜の上には、種特異的補体制御膜因子群（DAF, Decay accelerating factor; MCP, Membrane cofactor protein; HRF20, 20kDa Homologous restriction factorなど）が存在するが、同種のヒト補体の反応を防ぐために、補体反応を介した細胞溶解反応は起こらない。

一方、HIV感染細胞に反応するヒト血清中のIgM抗体は、HIV感染細胞を補体制御膜因子群に打ち勝ってヒト補体を介した細胞溶解反応を起こせることが発見された。

HIV感染によって発現が高まるGM2やGg4などのガングリオシドに対してIgM抗体がそのような作用を発揮することを知った（特開平9-227409（第2頁段落「0009」））。

5 前記ガングリオシドのGM2に対するヒトIgMモノクローナル抗体としてEBウイルスで不死化したヒトBリンパ芽球株が産生するL55が報告されている。このヒトIgMモノクローナル抗体を作用させたHIV感染細胞はヒト補体の反応を介して細胞溶解を起こすことがわかった。しかし、L55抗体はHIV感染細胞に特異的なわけではないので、HIV感染細胞以外の正常細胞にも反応する可能性がある。

10 発明の開示

本発明は、HIV感染細胞に特異的に反応し、感染細胞にアポトーシスを誘導して破壊に導くヒトIgM抗体を有効成分とするHIV感染患者治療剤等を提供することにある。

15 上記の課題を解決するための本発明の第1の解決手段として、HIV感染細胞を特異的に認識しアポトーシスを誘導するヒトIgMに属することを特徴とするモノクローナル抗体を提供する。

また、本発明の第2の解決手段は、HIV感染細胞を特異的に認識し、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導ヒトIgM抗体を有効成分として含有することを特徴とするHIV感染症治療剤を提供する。

20 本発明の第3の解決手段は、AIDSの発症を防止するためのものである請求項2記載の治療剤を提供する。

本発明の第4の解決手段は、HIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体がH鎖の可変領域の核酸配列が配列番号1の核酸配列を有する2G9抗体であることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体を提供する。

25 さらに、本発明の第5の解決手段は、HIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体のL鎖の可変領域の核酸配列が配列番号2の核酸配列を有する2G9抗体であることを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は2G9抗体の特異性を示す図面である。

フローサイトメトリー法で解析した結果、非感染細胞は2G9抗体で染色されずHIV感染細胞が染色されていることを示す (PBMC:末梢血リンパ球; IIB, primary isolate及びMNはHIV名)。

図 2 はHIV潜伏感染細胞にも2G9抗体が反応することを示す図面である。

潜伏感染細胞であるOM10.1細胞は、HIV膜蛋白抗原であるgp120に対する抗体 (0.5 β) は反応しないが2G9抗体は反応することを示す。

図 3 は2G9抗体によるHIV感染細胞のアポトーシスを示す図面である。

10 HIVを感染させたMOLT-4/IIB細胞に2G9抗体を50 μ g/mlの濃度で添加し2日間培養すると、TUNEL法によるアポトーシス検出試薬で完全に染色されるようになることを示す。非感染MOLT-4細胞には全く影響を与えない。

図 4 は2G9抗体によるHIV潜伏感染細胞のアポトーシスを示す図面である。

15 HIVを感染させたOM10.1細胞に2G9抗体を12.5 μ g/mlの濃度で添加し、2日間培養すると、アポトーシス検出試薬Annexin V反応細胞が非添加時の5.5 %から、21.2 %に増加することを示す。

図 5 は2G9 μ 鎖発現プラスミド構築模式図を示す。

発明を実施するための形態

20 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はかかる実施例により何ら制限されるものではない。

本発明者らは、上記課題を解決するために、ヒトの免疫グロブリンに関する遺伝子を含む染色体を導入したキリンビール社製のマウス (TCマウス: trans-chromosome mouse) にHIV感染細胞を免疫して、HIV感染細胞に特異的に反応するヒト抗体を産生するマウスをえた。この免疫マウスの脾細胞をマウス骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマを定法に従って作成した。得られたハイブリドーマの中からHIV感染細胞に反応するモノクローナル抗体を産生するクローンを選び出し、そのハイブリドーマクローンを2G9細胞株と命名した。2G9細胞株が産生するモノクローナル抗体である2G9抗体はヒト μ 鎖とヒト κ 鎖から成るヒトIgMモノクローナル抗体である。2G9

抗体はHIV感染細胞に特異的に反応するが、潜伏感染細胞株のOM10.1にも反応でき、これらの細胞にアポトーシスを誘導して破壊することができることを確認し、本発明を完成するに至った。本発明2G9抗体を産生する細胞株2G9は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1 中央第6）に

5 2003年5月8日に国際寄託し、寄託番号FERM BP-8378が付与された。

2G9抗体と反応する抗原（2G9抗原）は、SDS処理により2G9抗体との反応性を失うと考えられる。

2G9抗体をコードする κ 鎖及び μ 鎖それぞれにおける可変領域の遺伝子の塩基配列についての解析結果は、表1に示すごとくである。定常領域については、既報の塩基

10 配列とほぼ同様である。

（表1）

μ 鎖可変領域の塩基配列：

TGCCCTGGATTCCAAGGCCTATCCACTTGGTGATCAGCACTGAGCACCGAGG
ATTCACCATGGAAGCTGGGGCTCCGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATTTTAGAA
15 GGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAG
CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTA
CTTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG
TCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTACATATACTACGCAGACTCAGTGAA
GGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAA
20 ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
CTCCTTATAGCAGTGGCTGGCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT
CCTCA

κ 鎖可変領域の塩基配列：

25 CTCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGGACT
CCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATACCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCT
CCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
CGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA
AGTTCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCA

TCTCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA
GCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGC
CCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

OM10.1細胞を含め、HIV感染細胞に対して請求項1に記載の抗体、たとえば2G9
5 抗体はアポトーシスを惹起させる特徴を有している。すなわち、これはHIV感染細胞
を特異的にアポトーシスに陥らせることが出来るヒトIgMモノクローナル抗体であり、
OM10.1細胞等のHIV潜伏感染細胞などに対してもアポトーシスを誘導することがで
きる。化学療法剤が効果を発揮することが出来ないHIV感染患者の体内に潜むHI
V潜伏感染を排除するための治療剤としても使用することが出来る。

10 本発明のHIV感染細胞に特異的に反応し、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導して
破壊に導く、ヒトIgM抗体を有効成分とするHIV感染患者治療剤等に利用するための
治療剤は、生理学的なキャリアと組み合わせることによって得ることができる。生理
学的に受容可能なキャリアは当該分野で周知であり、そして生理学的緩衝化食塩水も
しくは他の緩衝作用を有する水溶液、又は溶媒、あるいはグリコール、グリセロール、
15 油（例えば、オリーブ油）、又は注射可能な有機エステルのような溶剤を含む。生理
学的に受容可能なキャリアはIgM抗体を安定化させるか、吸収を増大させる化合物を
も含む。このような生理学的に受容可能な化合物は、例えば、グルコース、スクロー
ス、又はデキストラン等の糖類、アスコルビン酸、又はグルタチオン等の抗酸化剤、
キレート剤、あるいはアルブミン等のタンパク質、または他の安定化剤、賦形剤を含
20 む。さらに、逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤等の他の生理活性物質を添加す
ることも可能である。生理学的に受容可能なキャリアの選択は、投与経路、対象疾患
によりそれぞれに組み合わせることができる。

実施例1. 2G9抗体の特異性

25 2G9抗体による、HIV感染細胞に対する反応性をフローサイトメトリー法で解析し
た。培養細胞株であるU937細胞、MOLT-4細胞およびCEM細胞を被験細胞として用
いた。HIV感染細胞としては、U937細胞にHIV-1のIIB株を感染させたU937/IIB、臨
床分離株（primary isolate）のmomo株を感染させたU937/primary isolate、MN株を感
染させたU937/MNおよび、MOLT-4にIIB株を感染させたMOLT-4/IIBなどを用いた。
それぞれの細胞に2G9抗体を作用させて洗浄後、蛍光色素で標識した抗ヒトIgM抗体

で染色し、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。その結果、2G9抗体はHIV感染細胞のU937/IIIB、U937/primary isolate、U937/MNおよびMOLT-4/IIIBを強く染色したが、非感染のU937細胞、MOLT-4細胞およびCEM細胞に対しては全く染色性を示さなかった。さらに、正常人の末梢血リンパ球および末梢血リンパ球をフ
5 イトヘモアグルチニン (PHA) で刺激して3日間培養した活性化リンパ球などについても解析を行ったが、これらも2G9抗体とは反応しなかった。したがって、2G9抗体はHIV感染細胞に特異的に反応するが、正常細胞には反応しないことが明らかとなった (図1)。さらに、OM10.1細胞はHIV潜伏感染細胞株とされ、gp120などのHIVの抗原は通常は発現していない。ところが、2G9抗体はOM10.1細胞に対して反応したの
10 で、潜伏感染状態の細胞に対しても、2G9抗体が反応しうることが明らかになった (図2)。

実施例2. 2G9抗体によるHIV感染細胞のアポトーシス

HIV-1を感染させたMOLT-4/IIIB細胞を20%非働化ヒト血清を添加したRPMI1640
15 培地に 5×10^5 /mlに調製し、これに100 μ g/mlの2G9抗体を等容量加えて2日間5%炭酸ガス培養器 (37度C) 中で培養した。培養後、アポトーシスの指標であるDNAフラグメンテーションをTUNEL法を用いて染色した後、1%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定してフローサイトメトリーで解析した。図3に示すように、2G9抗体を作用させてないときには染色されないが、2G9抗体の存在下で培養した時には完全染色され、2G9抗体には、感染細胞に対してアポトーシスを誘導する作用があることが認め
20 られた。非感染細胞のMOLT-4細胞に対してはこのような傷害作用を示さなかった (図3)。

実施例3. 2G9抗体によるHIV潜伏感染細胞のアポトーシス

HIV-1潜伏感染細胞株であるOM10.1細胞を20%非働化ヒト血清を含む細胞培養液 (RPMI1640培地) 中に 1×10^5 /mlに調製し、これに12.5 μ g/mlの2G9抗体を等容量加
25 えて2日間37度で培養した。培養後、アポトーシス検出試薬であるAnnexin Vで染色したあと、1%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定してフローサイトメトリーで解析した。その結果、図4に示すように、2G9抗体を作用させてないときには5.5%の染色度であったものが、2G9抗体の存在下で培養した時には21.2%の染色度を示し、2G9抗体には、HIV-1潜伏感染細胞のOM10.1細胞に対してもアポトーシスを誘導する

作用があることが認められた（図4）。

実施例4. 抗体の遺伝子工学的手法を用いた再構築

表1に示した2G9抗体可変領域の塩基配列を基にして2G9抗体を再構築する方法は、以下に示すshot-gun ligation method (Grundstrom, T. et al. NucleicAcid Res. 13, 3305-3316 (1985)) 等の遺伝子工学的手法を用いて2G9抗体を産生する細胞株を樹立
5 する方法を例示する。

表記の塩基配列を翻訳し、2G9抗体の可変領域のアミノ酸配列を得る。2G9抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列はオリジナルの2G9抗体可変領域の塩基配列に加えて、さらにその使用コドンを変化させることにより表2に示すように多
10 種存在する。それらの中からオリゴヌクレオチドとして化学合成可能な適当な長さ毎に、ある種の制限酵素認識断片を持つものを選び出した（表2）。

（表2）2G9抗体のアミノ酸配列と同等のアミノ酸をコードするcDNA一例

1

M E L G L R W V F L V A I L E G V Q C E
 ATA GAA TTA GGT TTA CGT TGA GTT TTT TTA GTT GCT ATT TTA GAA GGT GTT CAA TGT GAA
 ATG GAG TTG GGC TTG CGC TGG GTC TTC TTG GTC GCC ATC TTG GAG GGC GTC CAG TGC GAG
 CTT GGA CTT CGA GTA CTT GTA GCA CTT GGA GTA
 CTC GGG CTC CGG CTG CTC GTG GCG CTC GGG GTG
 CTA CTA CTA CTA
 CTG CTG CTG CTG

21

V Q L V E S G G G L V K E G S L R L S
 GTT CAA TTA GTT GAA TCT GGT GGT TTA GTT AAA CCT GGT GGT TCT TTA CGT TTA TCT
 GTC CAG TTG GTC GAG TCC GGC GGC TTG GTC AAG CCC GGC TCC TTG CGC TTG TCC
 GTA CTT GTA TCA GGA GGA GGA CTT GTA CCA GGA GGA TCA CTT CGA CTT TCA
 GTG CTC GTG TCG GGG GGG GGC CTC GTG CCG GGG GGG TCG CTC CGG CTC TCG
 CTA AGT CTA AGT CTA CTA AGT CTA AGT
 CTG AGC CTG AGC CTG CTG AGC CTG AGC

41

C A A S G P T P S T Y S M N W V R Q A P

TGT GCT GCT TCT GGT TTT ACT TTT TCT ACT TAT TCT ATA AAT TGA GTT CGT CAA GCT CCT

TGC GCC GCC TCC GGC TTC ACC TTC TCC ACC TAC TCC ATG AAC TGG GTC CGC CAG GCC CCC

GCA GCA TCA GGA ACA TCA ACA TCA GTA CGA GCA CCA

GCG GCG TCG GGG ACG TCG ACG TCG GTG CGG GCG CCG

AGT

AGT

AGT

AGC

AGC

AGC

61

G K G L E W V S S I S S S S Y I Y Y A

GGT AAA GGT TTA GAA TGA GTT TCT TCT ATT TCT TCT TCT TCT TCT TAT ATT TAT TAT GCT

GGC AAG GGC TTG GAG TGG GTC TCC TCC ATC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TAC ATC TAC TAC GCC

GGA GGA CTT GTA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA GCA

GGG GGG CTC GTG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG GCG

CTA

AGT AGT

AGT AGT AGT AGT AGT

CTG

AGC AGC

AGC AGC AGC AGC AGC

81

D S V K G R P T I S R D N A K N S L Y L
GAT TCT GTT AAA GGT CGT TTT ACT ATT TCT CGT GAT AAT GCT AAA AAT TCT TTA TAT TTA
GAC TCC GTC AAG GGC CGC TTC ACC ATC TCC CGC GAC AAC GCC AAG AAC TCC TTG TAC TTG
TCA GTA GGA CGA ACA TCA CGA GCA TCA CTT CTT
TCG GTG GGG CGG ACG TCG CGG GCG TCG CTC CTC
AGT AGT CTA CTA
AGC AGC CTG CTG

101

Q M N S L R A B D T A V Y Y C A R D L L
 CAA ATA AAT TCT TTA CGT GCT GAA GAT ACT GCT GTT TAT TAT TGT GCT CGT GAT TTA TTA
 CAG ATG AAC TCC TTG CGC GCC GAG GAC ACC GCC GTC TAC TAC TGC GCC CGC GAC TTG TTG
 TCA CTT CGA GCA ACA GCA GTA GCA CGA CTT CTT
 TCG CTC CGG GCG ACG GCG GTG GCG CGG CTC CTC
 AGT CTA CTA CTA
 AGC CTG CTG CTG

121

I A V A G H W G Q G T L V T V S S
 ATT GCT GTT GCT GGT CAT TGA GGT CAA GGT ACT TTA GTT ACT GTT TCT TCT
 ATC GCC GTC GCC GGC CAC TGG GGC CAG GGC ACC TTG GTC ACC GTC TCC TCC
 GCA GTA GCA GGA GGA ACA CTT GTA ACA GTA TCA TCA
 GCG GTG GCG GGG GGG ACG CTC GTG ACG GTG TCG TCG
 CTA AGT AGT
 CTG AGC AGC

制限酵素認識断片ごとに区切られた塩基配列を基にオリゴヌクレオチドを化学合成した。合成したオリゴヌクレオチドを順次それぞれの制限酵素で消化後、ライゲーションしていくことにより2G9抗体可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全長を得た。H鎖、L鎖とも同様に得られた2G9抗体可変領域のcDNA断片（それぞれrV μ 2G9, rV κ 2G9）をキメラ抗体作成法と同様にヒトIgM抗体H鎖、L鎖の定常領域遺伝子配列（C μ , C κ ）を有するベクターに組み込み、リコンビナント2G9 μ 鎖、 κ 鎖発現プラスミド（それぞれrV μ 2G9-C μ , rV κ 2G9-C κ ）を得た（図5）。

実施例5. リコンビナント抗体の発現

この再構成2G9抗体遺伝子発現プラスミドによって得られる抗体活性をCOS7細胞（ATCC CRL 1651）における一時発現系で検討した。これら2種のプラスミド（r

V μ 2G9-C μ , rV κ 2G9-C κ) とヒトIgM抗体 J 鎖発現プラスミド(Cj)の混合物をGIBCO社製のプロトコールどおりに、リポフェクトアミン試薬を用いて遺伝子を導入した。その後、通常培養条件下で2日間培養を続け、遺伝子導入細胞の培養上清を回収した。得られた培養上清を抗ヒト μ 抗体、抗ヒト κ 抗体を用いたサンドイッチELISA
5 法によるアッセイ系により、培養上清中に存在するリコンビナント2G9抗体を確認した。また、この培養上清を用いてU937細胞、MOLT-4細胞およびU937細胞にHIV-1のIIB株を感染させたU937/IIB、MOLT-4/IIBなどを用いてFACS解析を行って、前記した特異性を有する抗体であることを確認した。更に、蛍光標識したものの2G9抗体とこの培養上清を同時にU937/IIB、MOLT-4/IIBに作用させる競合阻害試験により
10 リコンビナント2G9抗体の活性を確認した。

したがって、表1に示された2G9抗体の μ 鎖、 κ 鎖可変領域の塩基配列が抗HIV活性を担う極めて重要な領域であることが確認された。

この結果から、これらの μ 鎖可変領域の塩基配列、及び κ 鎖可変領域の塩基配列をコードする遺伝子はリコンビナント抗HIV抗体を作成するにあたり極めて有用な遺
15 伝子であることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明により得られた2G9抗体は、潜伏感染細胞のOM10.1細胞に対してもアポトーシスを誘導する作用があることが認められた。感染細胞に対してアポトーシスを誘導
20 する作用が2G9抗体にあることが認められた。これに対し、非感染細胞のU937やMOLT-4細胞に対してはこのような傷害作用を示さなかった。この結果、潜伏感染細胞などに対してもアポトーシスを誘導できることから、化学療法剤が効果を発揮することが出来ない感染患者の体内に潜む潜伏感染を排除するための治療剤としても使用し
25 うる。また、リコンビナント抗HIV抗体を作成するにあたり極めて有用な μ 鎖可変領域の塩基配列、及び κ 鎖可変領域の塩基配列をコードする遺伝子を提供する。

請 求 の 範 囲

1. HIV感染細胞を特異的に認識し、アポトーシスを誘導するヒトIgMに属することを特徴とするモノクローナル抗体。
2. HIV感染細胞を特異的に認識し、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgM抗体を有効成分として含有することを特徴とするHIV感染症治療剤。
3. AIDSの発症を防止するためのものである請求項2記載の治療剤。
4. HIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体がH鎖の可変領域の核酸配列が配列番号1の核酸配列を有する2G9抗体であることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体。
5. HIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体のL鎖の可変領域の核酸配列が配列番号2の核酸配列を有する2G9抗体であることを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体。
6. HIV感染細胞を特異的に認識し、アポトーシスを誘導するヒトIgMに属することを特徴とする2G9抗体を産生する寄託番号FERM BP—8378である細胞株。
7. 寄託番号FERM BP—8378である細胞株が産生することを特徴とする請求項1から請求項5のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

補正書の請求の範囲

[2003年10月21日(21.10.03)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲1, 2及び6は補正された。他の請求の範囲は変更なし。(1頁)]

請 求 の 範 囲

1. (補正後) 腫瘍細胞や正常細胞に発現が認められず、HIV 感染細胞に特異的に発現する抗原を認識し、アポトーシスを誘導するヒト IgM に属することを特徴とするモノクローナル抗体。
2. (補正後) 腫瘍細胞や正常細胞を認識せず、HIV 感染細胞を特異的に認識し、HIV 感染細胞にアポトーシスを誘導するヒト IgM 抗体を有効成分として含有することを特徴とする HIV 感染症治療剤。
3. AIDS の発症を防止するためのものである請求項 2 記載の治療剤。
4. HIV 感染細胞に反応するヒト IgM モノクローナル抗体が H 鎖の可変領域の核酸配列が配列番号 1 の核酸配列を有する 2G9 抗体であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載のヒト IgM モノクローナル抗体。
5. HIV 感染細胞に反応するヒト IgM モノクローナル抗体の L 鎖の可変領域の核酸配列が配列番号 2 の核酸配列を有する 2G9 抗体であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載のヒト IgM モノクローナル抗体。
6. (補正後) 腫瘍細胞や正常細胞を認識せず、HIV 感染細胞を特異的に認識し、アポトーシスを誘導するヒト IgM に属することを特徴とする 2G9 抗体を産生する寄託番号 FERM BP—8378 である細胞株。
7. 寄託番号 FERM BP—8378 である細胞株が産生することを特徴とする請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

条約第 19 条 (1) に基づく説明書

請求の範囲第 1 項は、「**HIV 感染細胞**を特異的に認識し、アポトーシスを誘導するヒト **IgM** に属することを特徴とするモノクローナル抗体。」であります。これを「腫瘍細胞や正常細胞に発現が認められず、**HIV 感染細胞**に特異的に発現する抗原を認識し、アポトーシスを誘導するヒト **IgM** に属することを特徴とするモノクローナル抗体。」として、引例文献に開示されていない「腫瘍細胞や正常細胞に発現が認められず、」及び「発現する抗原を」を追加して、引用例との相違を明確にしました。

引用例は標的となっている抗原分子は **Fas** 抗原であります。これは **HIV 感染細胞**に限らず、種々の腫瘍細胞や正常細胞でも発現が認められ、発明者等の知見では、**HIV 感染**により **Fas** 抗原の発現はむしろ低下していました。

また、アポトーシスを起こす標的抗原分子としては、**Fas** 抗原以外にも **TNF-alpha** レセプターなど **TNF** レセプターファミリーの分子など多くのものが知られていますが、**2G9** 抗原はそれらの既知の標的分子とは発現細胞などの特徴が全く異なり、新規な標的分子であります。特に **2G9** 抗原は **HIV 感染細胞**や **HIV 潜伏感染細胞**にだけに発現を認めた特異的な性質を持った分子であります。その **2G9** 抗原に特異的に反応するヒト **IgM** 抗体が **HIV 感染細胞**に特異的にアポトーシスを誘導して感染細胞を破壊できる新規な抗体を提供するものであります。

本発明は、発明者等のヒト **IgM** 抗体である **2G9** が反応する **2G9** 抗原は、明細書第 1 頁第 1 行目から記載致しておりますように、腫瘍細胞や正常細胞には発現を認められず、**HIV 感染細胞**にのみ発現が認められるものであります。したがって、**2G9** 抗原は既知のものとは全く異なった分子であり、本発明では、その **2G9** 抗原に特異的に反応する **IgM** 抗体を作用させると **HIV 感染細胞**にアポトーシスを誘導できることを発見したものであり、全く新規な発明であります。

請求の範囲 2 を「腫瘍細胞や正常細胞を認識せず、**HIV 感染細胞**を特異的に認識し、**HIV 感染細胞**にアポトーシスを誘導するヒト **IgM** 抗体を有効成分として含有することを特徴とする **HIV 感染症治療剤**。」と補正し、引例との相違を明確に致しました。

請求の範囲 6 を「腫瘍細胞や正常細胞を認識せず、**HIV 感染細胞**を特異的に認識し、アポトーシスを誘導するヒト **IgM** に属することを特徴とする **2G9** 抗体を産生する寄託番号 **FERM BP-8378**である細胞株。」と補正し、引例との相違を明確に致しました。

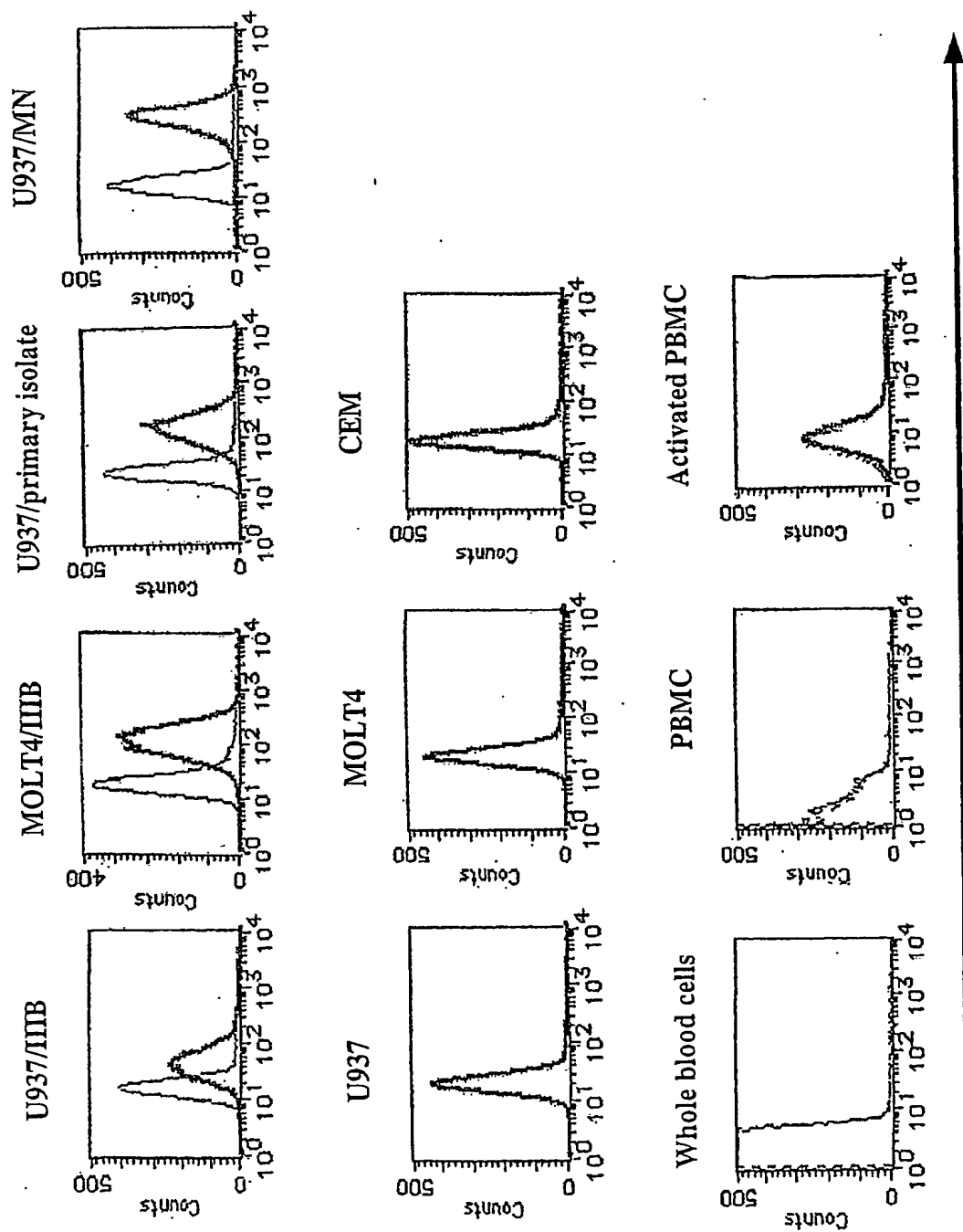


図 1

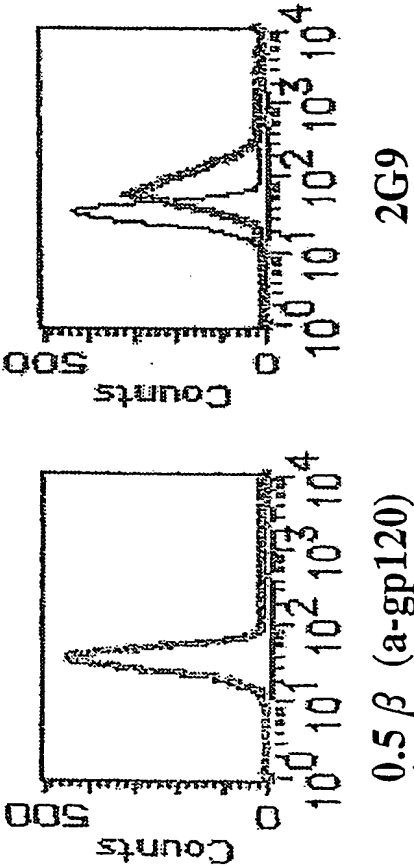


図2

図3

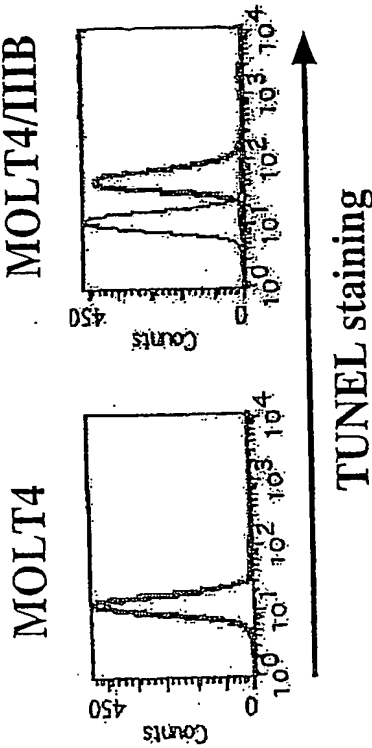
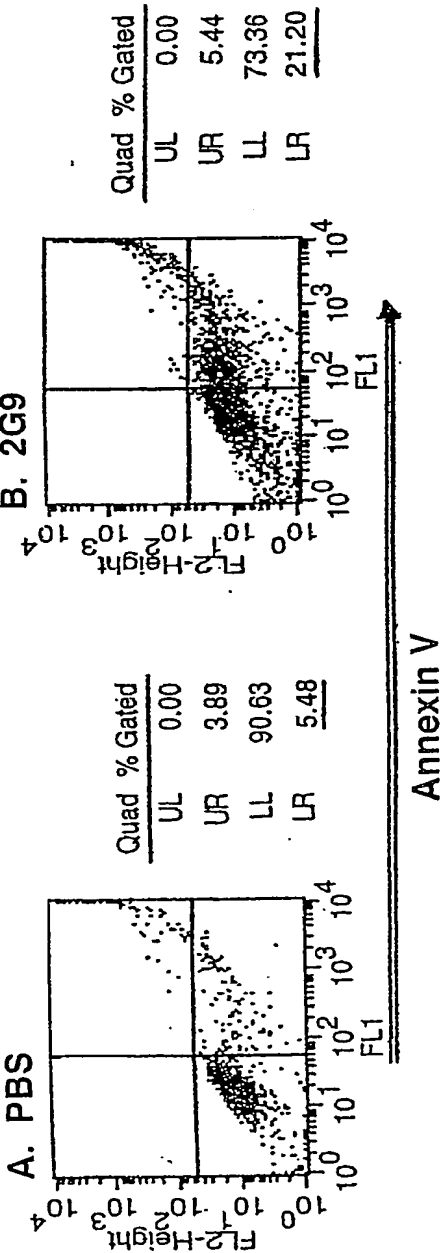


図4



SEQUENCE LISTING

<110> Noriko, Okada
Hidechika, Okada

<120> Human IgM monoclonal antibody that induce apoptosis of HIV infected cells.

<130> T-070102-3

<150> 2002-227953

<151> 2002-07-01

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 470

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> variable region of human μ -chain

<220>

<221> V-region

<222> (1).. (470)

<223>

<400> 1

tgccctggat tccaaggcct atccacttgg tgatcagcac tgagcaccga ggattcacca 60
tggaactggg gctccgctgg gtttccttg ttgctatattt agaagggtgc cagtgtgagg 120
tgcagctggt ggagtctggg ggaggcctgg tcaagcctgg ggggtccctg agactctcct 180
gtgcagcctc tggattcacc ttcagtactt atagcatgaa ctgggtccgc caggctccag 240
ggaaggggct ggagtgggtc tcatccatta gtagtagtag tagttacata tactacgcag 300
actcagtga gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactca ctgtatctgc 360
aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga gatctcctta 420
tagcagtggc tggccactgg ggccaggga ccttgggtcac cgtctcctca 470

<210> 2

<211> 404

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> variable region of human k-chain

<220>

<221> V-region

<222> (1).. (404)

<223>

<400> 2

ctcagtcagg acacagcatg gacatgaggg tccctgctca gtccttgga ctcctgtgc	60
tctggctccc agataccaga tgtgacatcc agatgacca gtctccatcc tccctgtctg	120
catctgtagg agacagagtc accatcacit gccgggcgag tcagggcatt agcaattatt	180
tagcctggta tcagcagaaa ccagggaag ttcctaaact cctgatctat gctgcatcca	240
ctttgcaatc aggggtccca tctcggttca gcggcagtgg atctgggaca gatttcactc	300
tcaccatcag cagcctgcag cctgaagaig ttgcaactta ttactgtcaa aagtataaca	360
gtgccccgta cacttttggc caggggacca agctggagat caaa	404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N5/16, C12N15/13, A61K39/395, A61P31/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K1/00-C07K19/00, C12N1/00-C12N15/90, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/BIOSIS (DIALOG), GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N. ITOH et al., The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis. Cell, Vol.66, No.2, pages 233 to 243, 1991	1-7
X	WO 97/22361 A1 (Hidechika OKADA), 26 June, 1997 (26.06.97), Claims; examples & JP 9-227409 A & US 6190863 B1 & KR 2000-64360 A & CN 1205642 A & AU 719412 B	1-7
X	EP 510691 A1 (Osaka Bioscience Institute), 28 October, 1992 (28.10.92), Full text & JP 5-184368 A & US 5874546 A & CA 2067031 A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
05 August, 2003 (05.08.03)

Date of mailing of the international search report
19 August, 2003 (19.08.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08305

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Edited by Yoshihide TSUJIMOTO, "Saishin Apoptosis Jikkenho (Separate Volume Experimental Medicine, Bio Manual UP Series), 25 March, 1997 (25.03.97); pages 112 to 117	1-7
A	R. Klein et al., Expressed Human immunoglobulin κ genes and their hypermutation. Eur. J. Immunol., Vol.23, pages 3248 to 3271, 1993; Full text	1-7
A	X. Wang and B.D. Stollar, Immunoglobulin VH Gene Expression in Human Aging. Clinical Immunology, Vol.93, No.2, pages 132 to 142, 1999; Full text	1-7
A	WO 00/18426 A1 (The Institute of Physical and Chemical Research), 06 April, 2000 (06.04.00), Full text & AU 9921851 A	1-7
A	TIA-1 "Cytotoxic cell" Marker, [on line], Beckman Coulter Kabushiki Kaisha, 1999 [retrieval date 01 August, 2003 (01.08.03)], Internet <URL:http://www.bc-cytometry.com/reagent/TIA-1.html>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/08305

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08305

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The technical matter common to claims 1, 2 and 6 resides in "a human antibody specifically recognizing HIV-infected cells and inducing apoptosis (hereinafter the antibody)".

As the results of the search, however, it is found out that the antibody is not novel because of having been disclosed in document 1 (N. Itoh, et al., The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis. Cell, Vol. 66, No. 2, pages 233 to 243, 1991), document 2 (WO 97/22361 A1 (Hidechika OKADA), 26 June, 1997 (26. 06. 97), claims, examples), document 3 (EP 510691 A1 (Osaka Bioscience Institute), 28 October, 1992 (28.10.92), full text) and document 4 (edited by Yoshihide TSUJIMOTO, Saishin Apoptosis Jikkenho (Experimental medicine, separate volume, Bio Manual UP Series), 25 March, 1997 (25.03.97), pages 112 to 117).

Consequently, the antibody falls within the category of prior art and, therefore, the common matter (the antibody) cannot be considered as a special technical feature in the meaning as described in the second sentence of PCT Rule 13.2.

Thus, there is no matter common to the above claims.

Since there is no other matter seemingly being a special technical feature in the meaning as described in the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy in the meaning as described in PCT Rule 13 can be found out among these inventions differing from each other.

Such being the case, it is clear that claims 1, 2 and 6 do not fulfill the requirement of the unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁷ C07K16/18, C12N5/16, C12N15/13, A61K39/395, A61P31/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁷ C07K1/00-C07K19/00, C12N1/00-C12N15/90, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG),

GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	N. Itoh, et al., The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis. Cell, Vol.66, No.2, p233-243, 1991	1-7
X	WO, 97/22361, A1 (岡田秀親), 1997. 06. 26. 特許請求の範囲、各実施例 &JP, 9-227409, A &US, 6190863, B1 &KR, 2000-64360, A &CN, 1205642, A &AU, 719412, B	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 08. 03

国際調査報告の発送日

19.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 東井一郎

4B

9636

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 510691, A1 (財団法人大阪バイオサイエンス研究所), 1992. 10. 28, 文献全体 &JP, 5-184368, A &US, 5874546, A &CA, 2067031, A	1-7
X	辻本賀英編、最新アポトーシス実験法 (実験医学別冊、バイオマニュアルUPシリーズ)、1997年3月25日 第112-117頁	1-7
A	R. Klein, et al., Expressed Human immunoglobulin κ genes and their hypomutation. Eur. J. Immunol., Vol.23, p3248-3271, 1993 文献全体	1-7
A	X. Wang and B. D. Stollar, Immunoglobulin VH Gene Expression in Human Aging. Clinical Immunology, Vol.93, No.2, p132-142, 1999 文献全体	1-7
A	WO, 00/18426, A1 (理化学研究所), 2000. 04. 06, 文献全体 &AU, 9921851, A	1-7
A	TIA-1 "Cytotoxic cell" マーカー、[on line]、ベックマン・コールター (株)、1999年、[検索日: 2003年8月1日]、インターネット<URL: http://www.b-cytometry.com/reagent/TIA-1.html >	1-7

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第Ⅱ欄の続き)

請求の範囲1、2、6に共通の技術的事項は、「HIV感染細胞を特異的に認識し、アポトーシスを誘導するヒト抗体（以下、本抗体）」である。

しかしながら、調査の結果、この本抗体は、文献1 (N. Itoh, et.al., The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis. Cell, Vol.66, No.2, p233-243, 1991)、文献2 (WO, 97/22361, A1 (岡田秀親), 1997. 06. 26, , 特許請求の範囲、各実施例)、文献3 (EP, 510691, A1 (財団法人大阪バイオサイエンス研究所), 1992. 10. 28, 文献全体)、文献4 (辻本賀英編、最新アポトーシス実験法 (実験医学別冊、バイオマニュアルUPシリーズ)、1997年3月25日、第112-117頁)に開示されているから、新規なものではないことが明らかになった。

結果として、本抗体は先行技術の域を出ないから、PCT規則13. 2の第2文の意味において、この共通事項（本抗体）は特別な技術的特徴ではない。

したがって、上記請求の範囲に共通の事項はない。

PCT規則13. 2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことができない。

よって、請求の範囲1、2、6は発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。